

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 677 766

(21) N° d'enregistrement national : 91 07404

(51) Int Cl³ : G 01 N 27/30, 27/327, 33/66; C 12 N 11/04; C 12 Q 1/26

(12) DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 14.06.91.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 18.12.92 Bulletin 92/51.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche : *Se reporter à la fin du présent fascicule.*

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : ASULAB (S.A.) Société Anonyme — CH.

(72) Inventeur(s) : Grätzel Michael, Fraser David, Zakeeruddin Shaik Mohammed, Randin Jean-Paul et Frenkel Erik Jan.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire : ICB c/o Cabinet Lalanne Propriété Industrielle.

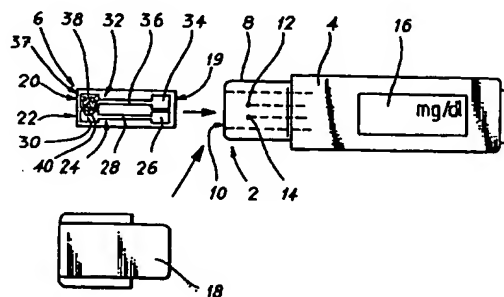
(54) Capteur de mesure de la quantité d'un composant en solution.

(57) La présente invention concerne un capteur de mesure de la quantité d'un composant en solution.

Le but de l'invention est de perfectionner les capteurs ampérométriques existants.

Ce but est atteint à l'aide d'un capteur muni d'une électrode de mesure (20) comprenant au moins un collecteur de courant (37), relié électriquement à l'un des contacts électriques (34) et recouvert d'un mélange (38) comprenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction spécifique dudit composant et au moins un médiateur transférant les électrons entre ladite enzyme et ledit collecteur de courant, caractérisé en ce que le médiateur est choisi parmi les complexes d'un métal de transition avec au moins un ligand terpyridine substitué ou non.

Ce capteur s'applique plus particulièrement à la détection du glucose.



FR 2 677 766 - A1



CAPTEUR DE MESURE DE LA QUANTITE D'UN COMPOSANT EN SOLUTION

La présente invention concerne un capteur de mesure de la quantité d'un composant en solution, destiné à être utilisé dans un dispositif de mesure ampérométrique de la concentration dudit composant dans la solution. Ce capteur permet notamment de doser le
5 glucose.

De nombreux malades atteints de diabète, doivent mesurer fréquemment leur taux de glucose sanguin ou glycémie. S'ils détectent un état d'hyperglycémie, ils doivent immédiatement prendre des médicaments régulant leur taux de glucose. Afin de faciliter la vie
10 courante de ces malades, de nombreux dispositifs de mesure du glucose miniaturisés et utilisables par un néophyte, sont apparus sur le marché.

Par ailleurs, on envisage de réaliser des implantations de pompes à insuline chez les diabétiques. Ces pompes à insuline
15 doivent être munies de dispositifs de mesure du glucose également implantables et qui, en fonction de la glycémie mesurée, donnent une information à la pompe pour la mise en marche éventuelle de celle-ci.

La plupart de ces dispositifs de mesure de la glycémie utilisent
20 une enzyme spécifique du glucose, la glucose oxydase (GOD).

Comme illustrée à la figure 1 annexée, la GOD est une flavoprotéine, (obtenue par exemple à partir de moisissures) qui catalyse l'oxydation du glucose, ici par exemple le glucose sanguin, en gluconolactone, avec formation de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 , à
25 partir de l'oxygène moléculaire O_2 présent dans la solution à tester, ici dans le sang.

Cette enzyme (la GOD) et l'oxygène, ont donc été fréquemment utilisés dans des dispositifs de mesure du glucose dans lesquels l'oxydation du glucose était détectée par un transducteur électrique
30 ou optique.

De même, cette enzyme (la GOD) et l'oxygène ont souvent été utilisés dans des dispositifs dits ampérométriques et leur emploi est décrit dans la littérature.

Ces dispositifs dits "ampérométriques" comprennent d'une part, un
35 appareil de mesure muni d'au moins deux contacts électriques reliés

à un ampèremètre et à des moyens d'affichage et d'autre part, un capteur éventuellement jetable, pouvant être relié à ces deux contacts électriques. Ce capteur comprend au moins deux électrodes, l'une de référence et l'autre de mesure. L'électrode de mesure
5 comprend un conducteur métallique recouvert d'une enzyme spécifique du produit que l'on cherche à détecter.

La figure 2 annexée illustre les réactions chimiques survenant au niveau de cette électrode de mesure. Lorsque l'on dépose la solution à tester sur l'électrode de mesure, le produit à tester
10 (ici le glucose) réagit avec l'enzyme (ici la GOD oxydée) se trouvant sur l'électrode, pour former du gluconolactone, tandis que la GOD passe à l'état réduit ($GOD(H_2)_{(red)}$). Cette GOD réduite réagit alors avec l'oxygène O_2 qui passe à l'état réduit H_2O_2 et qui transfère alors deux électrons e^- vers le conducteur électrique C
15 dont le potentiel est fixe et se situe aux alentours de 650 mV (par rapport à une électrode de référence au calomel). Le fait que l'on soit obligé de travailler à des potentiels élevés entraîne des problèmes supplémentaires d'interférences. L'oxygène a donc un rôle de médiateur, puisqu'il permet le transfert d'électrons. Ce trans-
20 fert d'électrons, proportionnel à la quantité de glucose présente dans la solution à tester, est alors mesuré par l'ampèremètre et la quantité du glucose présente dans la solution est affichée par les moyens d'affichage de l'appareil de mesure.

Des recherches complémentaires ont montré que des dispositifs
25 ampérométriques utilisant des médiateurs non physiologiques, organiques, inorganiques ou organométalliques pouvaient supplanter les dispositifs utilisant l'oxygène comme médiateur. En effet, comme on peut le constater sur la figure 2, les dispositifs utilisant l'oxy-
gène comme médiateur ne peuvent pas être utilisés dans des solutions
30 où la concentration stoechiométrique en oxygène est inférieure à la concentration du composant que l'on désire mesurer. Car sinon, dans ce cas, tandis que la totalité du composant à mesurer a la possibi-
lité de réagir avec l'enzyme oxydée pour former l'enzyme réduite, seule une partie de la quantité totale d'enzyme réduite peut réagir
35 avec l'oxygène présent, proportionnellement à cette quantité d'oxygène. Le reste de l'enzyme réduite ne peut pas réagir et la quantité

d'électrons transmise au conducteur C est inférieure à ce qu'elle devrait être.

5 En conséquence, lorsqu'on utilise ce type de dispositif, on est soit limité par les concentrations respectives de l'oxygène et du composant à mesurer, soit obligé d'utiliser une membrane pour limiter la diffusion dudit composant. Ceci explique pourquoi on a cherché à réaliser des dispositifs ampérométriques utilisant un médiateur approprié, remplaçant l'oxygène.

10 De très nombreux médiateurs ont été cités dans la littérature, tels que les ferrocènes monomères (Cass, A.E.G. et ses collaborateurs (1984), Anal. Chem. 56, 667-671; Degani, Y. et Heller, A. (1987), J. Phys. Chem. 91, 1285-1289), les ferrocènes greffés sur un polymère (Foulds, N.C. et Lowe, C.R. (1988) Anal. Chem. 60, 2473-2478), les sels conducteurs de transfert de charge (Albery, W.J. Bartlett, P.N. et Craston, D.H. (1985) J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem. 194, 223-235), les cyclames de nickel (Taniguchi, I., Matsushita, K., Okamoto, M., Collin, J-P et Sauvage, J-P (1990) J. Electroanal. Chem. Interfacial. Electrochem. 280, 221-226) et des composés organiques tels que les quinones et les benzoquinones (Kulys, J.J., et Cénas, N.K. (1983) Biochim. Biophys. Acta 744, 57). Du fait des travaux importants de Hill et ses collaborateurs, par exemple Frew, J.E., et Hill, H.A.O. (1987) (Phil. Trans. R. Soc. Lond. B316, 95-106)), la famille des composés du ferrocène a été largement instituée et utilisée comme médiateur pour la GOD et d'autres flavoprotéines. En conséquence, on connaît un capteur actuellement commercialisé utilisant comme médiateur, un membre de la famille des composés du ferrocène.

25 Malheureusement, les médiateurs existant actuellement ont rarement les propriétés idéales requises, à savoir, un potentiel électrochimique adapté à l'enzyme choisie, une solubilité adéquate, une bonne stabilité chimique à la lumière, à la température et au pH et une interaction rapide avec l'enzyme choisie.

L'invention a pour objet de remédier aux inconvénients précédemment cités.

A cet effet, l'invention concerne un capteur de mesure de la quantité d'un composant en solution, comprenant :

- au moins une électrode de mesure et une électrode de référence, isolées électriquement l'une de l'autre et destinées à venir en contact avec ladite solution, lesdites électrodes comprenant respectivement des contacts électriques adaptés pour être branchés sur un dispositif d'exploitation du signal fourni par ledit capteur,
- l'électrode de mesure comprenant au moins un collecteur de courant, relié électriquement à l'un desdits contacts électriques et recouvert d'un mélange comprenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction spécifique dudit composant et au moins un médiateur transférant les électrons entre ladite enzyme et ledit collecteur de courant.

Selon les caractéristiques de l'invention, le médiateur est choisi parmi les complexes d'un métal de transition avec au moins un ligand terpyridine substitué ou non.

Grâce aux caractéristiques du capteur selon l'invention et notamment grâce aux nouveaux médiateurs utilisés, on obtient une famille de capteurs présentant une large gamme de faibles potentiels d'oxydo-réduction et restant stables à l'air.

L'invention sera mieux comprise à la lecture de la description suivante des modes préférentiels de réalisation de l'invention, donnés à titre indicatif mais non limitatif, cette description étant faite en liaison avec les dessins joints dans lesquels :

- la figure 1 illustre l'oxydation du glucose en présence de glucose oxydase GOD,
- la figure 2 est un schéma illustrant les diverses réactions chimiques survenant au niveau d'un capteur de l'art antérieur,
- la figure 3 est une vue de dessus d'un appareil de mesure muni d'un capteur selon l'invention,
- la figure 4 représente la courbe de voltamétrie cyclique du complexe bis (2,2', 6', 2" - terpyridine) de cobalt (II) en l'absence de GOD et de glucose, à une vitesse de balayage du potentiel de 5 mV.s^{-1} , les mesures étant effectuées dans un tampon phosphate PBS,
- la figure 5 représente la même courbe que la figure 4 mais en présence de GOD et de glucose,

5 - la figure 6 représente la courbe de voltamétrie cyclique du complexe bis (4' - tolyl - 2,2', 6',2" - terpyridine) de cobalt (II) adsorbé sur une électrode de travail, en présence de GOD et en l'absence de glucose, à une vitesse de balayage du potentiel de 25 mV.s⁻¹, les mesures étant effectuées dans un tampon phosphate PBS,

 - la figure 7 représente la même courbe que la figure 6 mais en présence de glucose, et .

10 - la figure 8 représente deux courbes illustrant la variation de la densité du courant obtenu après 20 secondes (D_{20}) en fonction de la concentration en glucose, dans une solution physiologique et dans le sang, pour des mesures effectuées avec un capteur muni du complexe bis (2,2', 6',2" - terpyridine) de cobalt comme médiateur et polarisé à 100 mV par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl.

15 Comme illustré en figure 3, l'appareil de mesure 2 de la quantité d'un composant donné dans une solution, comprend un capteur 6 selon l'invention et un dispositif d'exploitation 4 du signal fourni par ledit capteur. Ce dispositif 4 est connu en soi et présente la forme générale d'un stylo. Il est bien évident que cette forme n'est
20 pas limitative de l'invention.

 Ce stylo 4 comprend à l'une de ses extrémités référencée 8, une cavité 10 dans laquelle sont logés deux premiers contacts électriques 12, 14 connectés électriquement à un ampèremètre (non représenté). Cet ampèremètre est lui-même relié à un affichage 16 indiquant
25 la concentration du composant recherché dans une solution donnée. Cette concentration est affichée, par exemple en mg/dl ou en mmol/l. Le stylo 4 comprend en outre un bouchon 18 qui vient coiffer son extrémité 8 et protéger les contacts 12, 14, lorsque ledit stylo n'est
30 pas utilisé.

 Le capteur 6 selon l'invention a par exemple la forme d'une lamelle rectangulaire isolante que l'on peut introduire par l'une de ses extrémités référencée 19 dans la cavité 10 du stylo 4. On notera que ce capteur 6 est à usage unique.

35 Il comprend une électrode de mesure 20 et une électrode de référence 22 disposées, par exemple parallèlement longitudinalement sur le capteur 6. L'électrode de référence 22 comprend une bande 24

réalisée en matière électriquement conductrice. Cette bande 24 présente trois zones, une zone 26 dite de contact électrique, prévue vers l'extrémité 19 dudit capteur, une zone centrale 28 dite "piste conductrice" et une zone 30, prévue à l'autre extrémité du capteur et dite "collecteur de courant". De façon assez similaire, l'élec-
5 trode de mesure 20 comprend une bande 32 réalisée en matière électriquement conductrice. Cette bande 32 comprend également trois zones, un contact électrique 34, une piste conductrice 36 et un collecteur de courant 37, recouvert contrairement au collecteur 30, d'un mélange 38.
10

Sur la figure 3, ce collecteur 37 n'est pas vraiment visible puisqu'il est caché par le mélange 38. On notera que dans chacune de ces électrodes, le collecteur et le conducteur de courant pourraient être en deux parties reliés électriquement entre elles et ne nécessitent pas obligatoirement d'être sous forme d'une bande unique 24
15 ou 32. Le mélange 38 comprend au moins une enzyme d'oxydo-réduction spécifique du composant à mesurer et au moins un médiateur transférant les électrons entre ladite enzyme et le collecteur de courant formé dans la bande 32.

De façon optionnelle, le mélange 38 précité peut également comprendre au moins une matière conductrice active et/ou au moins un additif qui sera décrit ultérieurement. Dans le cas où le mélange 38 comprend une matière conductrice active, le médiateur transfère les électrons entre l'enzyme et cette matière conductrice active qui à
20 son tour, transfère les électrons vers le collecteur de courant.
25

La goutte 40 de l'échantillon de solution à tester, est déposée à cheval sur les deux électrodes 20 et 22 comme illustré en figure 4. Ainsi, le circuit électrique constitué par l'ampèremètre, les contacts 14 et 26, la piste conductrice 28, le collecteur 30, la
30 goutte de solution 40, le mélange 38, le collecteur 37, la piste conductrice 36 et les contacts 34 et 12, est fermé.

L'appareil de mesure 2 qui vient d'être décrit est destiné à la réalisation de mesures in vitro, toutefois il est bien évident que le capteur 6 pourrait être utilisé in vivo, dans des appareils de
35 mesure implantables. Dans ce cas, sa forme ou ses dimensions seraient adaptées à cette nouvelle application.

Par ailleurs, pour obtenir une précision accrue, on pourrait ajouter une deuxième électrode de mesure, de façon à former une structure à 3 électrodes. Cette deuxième électrode de mesure serait identique à l'électrode de mesure 20 mais sans l'enzyme ou avec
5 l'enzyme dénaturée et permettrait d'effectuer des mesures différentielles.

La goutte 40 de solution à tester peut être de nature biologique, par exemple, du sang ou de l'urine d'un être humain ou d'un animal, ou un milieu de fermentation de micro-organismes. Elle peut
10 éventuellement être d'origine synthétique, par exemple un tampon synthétique contenant des éléments à analyser.

On utilise comme enzyme d'oxydo-réduction, une enzyme spécifique du composant que l'on souhaite mesurer. De préférence selon l'invention, on utilise une enzyme choisie parmi les oxydases, les déshydrogénases et les flavoprotéines. Lorsque l'on souhaite réaliser un
15 capteur de glucose, on utilise la glucose oxydase GOD, par exemple une GOD présentant une activité d'environ 250 UI, obtenue à partir d'une moisissure d'Aspergillus niger et disponible par exemple chez la société Fluka, (Buchs, Suisse).

La matière conductrice active utilisée de façon optionnelle, se présente de préférence sous forme d'une poudre de carbone, de graphite, d'or, de platine, de palladium ou d'oxyde de métal conducteur, par exemple d'oxyde de ruthénium ou sous forme d'un film de polymère conducteur, par exemple le polypyrrole. On utilisera de
20 préférence le carbone connu sous la marque commerciale Vulcan XC72R et distribué par Cabot Corp, (Boston, Massachusetts).

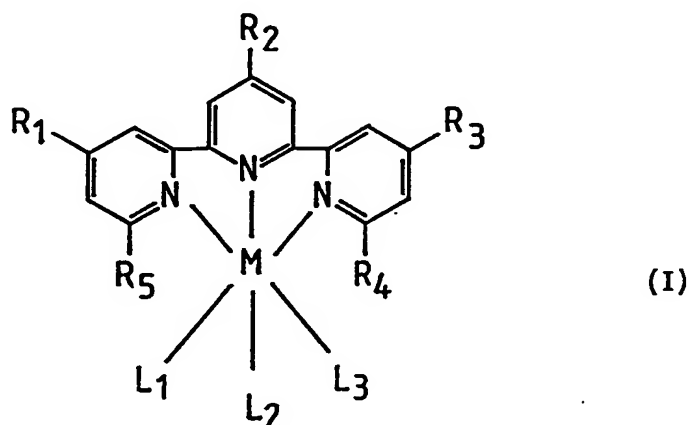
Comme on l'a vu précédemment, on peut également ajouter un additif formant un réseau d'immobilisation de l'enzyme, du médiateur et/ou de la matière conductrice active sur la surface du collecteur
30 37 de l'électrode de mesure 20. Cet additif est par exemple, la sérumalbumine bovine (BSA), le glutaraldéhyde, le carbodiimide ou des polymères solubles dans l'eau.

Les bandes de matière électriquement conductrices 24, 32 sont réalisées par exemple, sous forme d'une couche d'un matériau choisi
35 parmi l'or, l'argent, le platine, le palladium, le carbone, le graphite ou un oxyde de métal conducteur, tel qu'un oxyde de ruthénium, par exemple. De préférence, la bande 24 correspondant à

l'électrode de référence 22 est réalisée en argent et la bande 32 correspondant à l'électrode de mesure 20 est réalisée en platine. Plus précisément, la partie de la bande 24 correspondant au collecteur de courant 30 est partiellement chlorurée.

- 5 On a découvert qu'une nouvelle famille de complexes d'un métal de transition avec au moins un ligand terpyridine substitué ou non, présentait de bonnes propriétés de médiateur.

Le médiateur selon l'invention présente la formule générale suivante :



- 10 dans laquelle M est un métal de transition choisi parmi le cobalt, le chrome, le manganèse, le fer, l'osmium, le ruthénium ou le vanadium, les radicaux R₁ à R₅ qui peuvent être totalement ou partiellement identiques ou différents, représentent l'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy, un groupe amine primaire secondaire ou tertiaire ou un groupe pyridine substitué par un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy, un groupe amine primaire, secondaire ou tertiaire et les ligands L₁, L₂, L₃ sont des ligands formant un complexe de coordination avec le métal M.
- 15
20

Les ligands L₁, L₂, L₃ sont des ligands mono, bi ou tridenté et peuvent se combiner de la façon suivante :

- soit L_1 , L_2 , L_3 représentent chacun un ligand monodenté et sont totalement ou partiellement identiques entre eux ou différents les uns des autres,

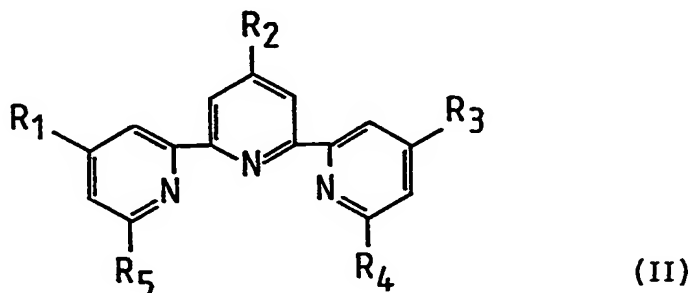
4 - soit L_1 et L_2 forment ensemble un ligand bidenté et L_3 représente un ligand monodenté,

- soit L_1 , L_2 et L_3 forment ensemble un ligand tridenté.

Parmi les ligands monodentés que l'on peut utiliser, on citera : CN^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , H_2O , NH_3 , la triphénylphosphine, les trialkylphosphines, les amines primaires, secondaire ou tertiaires,
10 la pyridine ou les pyridines substituées par Cl , NH_2 , NO_2 ou par un groupe alkyle.

Parmi les ligands bidentés que l'on peut utiliser, on citera : l'éthylène diamine, le 1,2 - bis (2 - pyridyl) éthane, l'acide oxalique $O^-CO-CO-O^-$, l'acétylacétone $CH_3-CO-CH_2-CO-CH_3$, la glycine
15 $NH_2-CH_2-COO^-$, et de préférence, les bipyridines et les phénanthro-
lines bisubstituées par un groupe R_6 et un groupe R_7 , R_6 et R_7
pouvant être identiques ou différents et représentant chacun l'hydrogène, NO_2 , Cl , un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe OH ,
un groupe alkoxy, un groupe aryloxy ou un groupe amine primaire,
20 secondaire ou tertiaire.

Parmi les ligands tridentés, on utilisera de préférence la terpyridine de formule générale (II)



dans laquelle les radicaux R_1 à R_5 qui peuvent être totalement ou partiellement identiques ou différents, représentent l'hydrogène, un

groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy, un groupe amine primaire secondaire ou tertiaire ou un groupe pyridine substitué par un atome d'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un
5 groupe aryloxy, un groupe amine primaire, secondaire ou tertiaire.

Les médiateurs préférés de la présente invention sont les suivants :

- le complexe bis (2,2', 6',2" - terpyridine) de cobalt,
- le complexe bis (4' - tolyl - 2,2', 6',2" - terpyridine) de
10 cobalt,
- le complexe mono (2,2', 6',2" terpyridine) mono (4'- tolyl - 2,2', 6',2" terpyridine) de cobalt.

Le capteur selon l'invention, muni des médiateurs précités, présente un certain nombre de propriétés variant en fonction des
15 ligands utilisés et des substitutions réalisées sur ces ligands.

Plusieurs expériences ont été réalisées qui prouvent les performances et l'efficacité de ces nouveaux médiateurs. Ces expériences sont décrites ci-après.

Expérience 1 :

20 Mesures de différents médiateurs par voltamétrie cyclique.

a) mesures effectuées avec le complexe bis (2,2',6',2" - terpyridine) de cobalt (II).

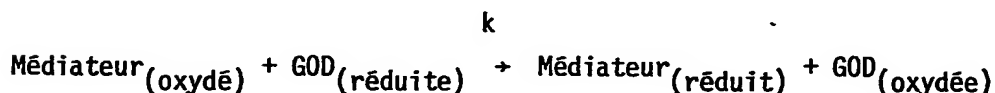
Ce complexe peut être synthétisé selon la méthode décrite dans Harris, C.M, Lockyer, T.N. et Stephenson, N.C. (1966) Aust. J. Chem.
25 19, 1741.

Le complexe précité a été testé par voltamétrie cyclique en courant continu, afin de déterminer son potentiel normal d'oxydo-réduction E° .

La voltamétrie cyclique consiste à disposer dans la solution à
30 analyser, une électrode de travail, une contre-électrode et une électrode de référence, puis à effectuer un balayage, à vitesse constante et entre deux bornes, du potentiel de l'électrode de travail et à mesurer l'intensité du courant obtenu. Les courbes des

- figures 4 et 5 représentent les résultats obtenus par cette méthode. Ces expériences ont été réalisées avec une électrode de travail en carbone vitreux, une électrode de référence au calomel, une contre-électrode en platine et une cellule électrochimique de 5 à 20 ml.
- 5 Tous ces éléments sont disponibles chez la société Metrohm (Hérisau, Suisse). Les mesures ont été réalisées dans un tampon phosphate PBS (NaCl 100mM, NaH_2PO_4 10mM, ajusté à pH 7,4; EDTA (acide éthylène tétraacétique) 0,1mM; PMSF (fluorure de phénylméthylsulfonate) 0,01mM et avec une concentration du complexe précité de $5 \cdot 10^{-4}$ M. On
- 10 a utilisé une vitesse de balayage du potentiel de 5 mV.s^{-1} . On obtient la courbe de la figure 4 et une valeur de E° de 30 mV par rapport à l'électrode de référence au calomel. L'addition d'une solution de glucose n'a aucun effet sur les courbes de la figure 4, ce qui est normal puisqu'il n'y a pas la glucose oxydase (GOD).
- 15 Au contraire, si l'on ajoute à la solution où le glucose est déjà présent, de la GOD (en quantité supérieure à $1 \cdot 10^{-7}$ M, de préférence $1 \cdot 10^{-6}$ M) on obtient la courbe de la figure 5, présentant une forme semblable à une "vague catalytique". Dans cette figure 5, on a utilisé également comme vitesse de balayage du potentiel :
- 20 5 mV.s^{-1} .

On obtient une première réaction :



qui est irréversible, (avec une constante k), et une seconde réaction :



qui est électrochimiquement réversible et extrêmement rapide.

La constante k correspond à la réaction de transfert d'électrons, à partir de la GOD, vers le médiateur.

- Le médiateur réalise un transfert électrochimiquement réversible
- 30 d'un électron vers les collecteurs de courant précédemment décrits.

Au cours de la première réaction, on peut mesurer la constante de second ordre k . Cette mesure est effectuée à l'aide d'une méthode optique. Pour le complexe étudié ici, on trouve $k = 1.10^3 \text{ M}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

5 b) mesures effectuées avec le complexe bis (4'- tolyl - 2,2', 6', 2'' - terpyridine) de cobalt (II).

10 La synthèse du 4' - tolyl - 2,2', 6', 2'' terpyridine est décrite dans Case, F. H. et Butte, W. A. (1961) J. Org. Chem. 4415. L'emploi du 4' - tolyl - 2,2', 6', 2'' - terpyridine dans des polymères est décrit dans Collin, J. P., Jouaiti, A. et Sauvage J. P. (1990) J. Electroanal. Chem. 286,75.

15 On a réalisé pour ce deuxième complexe, des mesures de voltamétrie cyclique, similaires à celles qui viennent d'être décrites. Du fait que ce complexe est uniquement soluble dans l'eau désionisée et dans les solvants organiques et donc insoluble dans le tampon phosphate PBS, on a déterminé le potentiel normal d'oxydo-réduction et le comportement électrochimique de ce complexe selon deux méthodes différentes.

20 Selon la première méthode, on a dissous ce deuxième complexe dans l'acétonitrile, CH_3CN contenant LiCl 2M. Cette électrolyte remplace ainsi le tampon PBS. On obtient alors par des mesures de voltamétrie cyclique une valeur de E_0 de 100 mV (par rapport à une électrode de référence au calomel), avec une vitesse de balayage de $25 \text{ mV}.\text{s}^{-1}$.

25 Toutefois, il est impossible d'étudier l'effet de la GOD sur cette courbe de voltamétrie cyclique, puisque la GOD est dénaturée par l'acétonitrile.

30 Selon la deuxième méthode, on conserve comme électrolyte le tampon phosphate PBS, mais on adsorbe ce complexe sur la surface d'une électrode de travail. Plus précisément, on incube une électrode en graphite spectroscopique dans une solution aqueuse de GOD (concentration 10 mg/ml) et du complexe précité (1 mg/ml), pendant 12 heures à 4° C. De préférence, on utilise une électrode en graphite commercialisée sous la marque Ellor 10, disponible chez Le Carbone Lorraine SA, France. Cette électrode ainsi préparée, rem-

place l'électrode de travail en carbone vitreux, décrite dans le paragraphe a). On conserve par contre l'électrode de référence au calomel et la contre-électrode en platine décrites dans le paragraphe a). On obtient alors par voltamétrie cyclique la courbe de la figure 6, réalisée à une vitesse de balayage du potentiel de 25 mV.s⁻¹. On obtient une valeur de $E_0 = 50$ mV (par rapport à l'électrode de référence au calomel).

L'addition d'une solution concentrée de glucose produit quelques changements sur la courbe de la figure 6. On obtient la courbe de la figure 7 qui est légèrement déplacée vers la direction d'oxydation.

On constate ainsi que ce deuxième complexe agit comme médiateur.

Expérience 2 :

Etalonnage du capteur dans du sang et du tampon.

On a fabriqué un capteur comprenant comme médiateur le complexe bis (2,2', 6',2" - terpyridine) de cobalt dénommé ci-après "complexe".

On a procédé en pratique de la façon suivante :

- a) on dissout 6,25 mg de ce complexe dans 2 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 6,8.
- b) on ajoute 25 mg de poudre de carbone Vulcan XC72R et l'on place le flacon 15 minutes aux ultrasons,
- c) on ajoute 38 mg de GOD, 25 μ l de glutarylaldéhyde à 25 %, 0,7 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 6,8 et 290 μ l de BSA (sérumalbumine bovine) à 15 %.

On dépose environ 70 μ l de ce mélange par cm² de collecteur de courant 37 afin de constituer une électrode de mesure 20.

Ces capteurs ont été testés, le lendemain de leur préparation.

Les courbes de la figure 8 illustrent des mesures potentiostatiques effectuées avec des capteurs présentant comme médiateur le "complexe" précédemment cité et en faisant varier la concentration de glucose dans des échantillons de sang ou de tampon phosphate PBS. Les mesures ont été effectuées à 100 mV (par rapport à une électrode de référence à Ag/AgCl) et la lecture de la densité de courant D20 a été faite après 20 secondes.

Les courbes C_1 et C_2 de la figure 8 correspondent respectivement à des mesures effectuées dans une solution physiologique et dans le sang.

5 Les différences observées entre les mesures effectuées dans la solution physiologique et dans le sang complet sont dues au même phénomène que celui décrit notamment dans (Fogh-Andersen, N. et ses collaborateurs (1990), Clin. Chim. Acta 189, 33-38), pour le plasma et le sang complet. Cette différence est principalement due au volume occupé par les protéines dans le sang complet.

10 Comme on peut le constater sur la figure 8, la courbe C_2 présente un tracé linéaire et une pente suffisamment importante jusqu'à des valeurs de 15 mM de glucose. En conséquence, chez un patient où les valeurs physiologiques du glucose peuvent varier typiquement de 3 à 15 mM, on peut utiliser de façon fiable le capteur selon l'in-
15 vention, puisqu'à une faible variation de la concentration en glucose correspond une variation suffisante de la densité de courant mesurée.

Enfin, on notera que ce nouveau médiateur permet de réaliser les mesures à un faible potentiel (100 mV) par rapport à une électrode à
20 Ag/AgCl.

On réduit ainsi les risques d'interférences dues à d'autres éléments se trouvant dans le sang, tels que des résidus de médicaments ou d'autres métabolites.

De plus, l'utilisation d'un faible potentiel permet d'obtenir,
25 avec un capteur muni seulement de deux électrodes, des résultats aussi bons que ceux fournis par un capteur à trois électrodes effectuant des mesures différentielles.

30

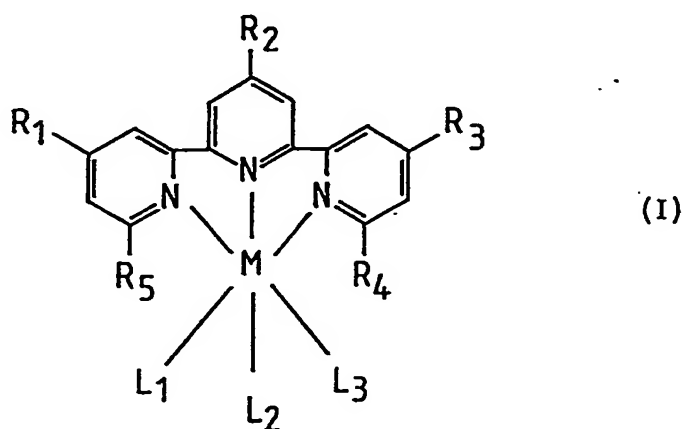
35

REVENDICATIONS

1. Capteur de mesure de la quantité d'un composant en solution, comprenant :

- au moins une électrode de mesure (20) et une électrode de référence (22), isolées l'une de l'autre et destinées à venir en contact avec ladite solution, lesdites électrodes (20, 22) comprenant respectivement des contacts électriques (34; 26) adaptés pour être branchés sur un dispositif d'exploitation (4) du signal fourni par ledit capteur,
- l'électrode de mesure (20) comprenant au moins un collecteur de courant (37) relié électriquement à l'un des contacts électriques (34) et recouvert d'un mélange (38) comprenant au moins une enzyme d'oxydo-réduction spécifique dudit composant et au moins un médiateur transférant les électrons entre ladite enzyme et ledit collecteur de courant, caractérisé en ce que le médiateur est choisi parmi les complexes d'un métal de transition avec au moins un ligand terpyridine substitué ou non.

2. Capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le médiateur présente la formule générale (I) suivante :



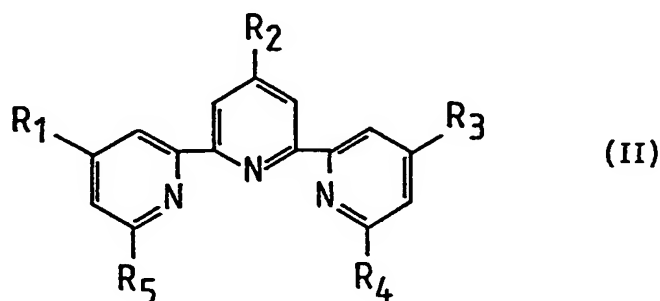
dans laquelle M est un métal de transition choisi parmi le cobalt, le chrome, le manganèse, le fer, l'osmium, le ruthénium ou le vanadium, les radicaux R_1 à R_5 qui peuvent être totalement ou partiellement identiques ou différents représentent chacun l'hydro-

gène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy, un groupe amine primaire, secondaire ou tertiaire ou un groupe bipyridine substitué par l'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy ou un groupe amine primaire, secondaire ou tertiaire, et L_1 , L_2 , L_3 sont des ligands formant un complexe de coordination avec le métal M.

3. Capteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que les ligands L_1 , L_2 et L_3 qui sont totalement ou partiellement identiques entre eux ou différents les uns des autres, sont des ligands monodentés choisis parmi CN^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , H_2O , NH_3 , la triphénylphosphine, les trialkylphosphines, les amines primaires, secondaires ou tertiaires, la pyridine ou les pyridines substituées par Cl^- , NH_2 , H_2O ou un groupe alkyle.

4. Capteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que les ligands L_1 et L_2 forment ensemble un ligand bidenté choisi parmi l'éthylène diamine, le 1,2-bis(2-pyridyl) éthane, l'acide oxalique, l'acétylacétone, la glycine ou les bipyridines et les phénantrolines bisubstituées par un groupe R_6 et un groupe R_7 , R_6 et R_7 étant identiques ou différents et représentant chacun l'hydrogène, NO_2 , Cl^- , un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe OH, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy ou un groupe amine primaire, secondaire ou tertiaire et en ce que L_1 est un ligand monodenté choisi parmi CN^- , Cl^- , Br^- , I^- , SCN^- , H_2O , NH_3 , la triphénylphosphine, les trialkylphosphines, les amines primaires, secondaires ou tertiaires, la pyridine ou les pyridines substituées par Cl^- , NH_2 , H_2O ou un groupe alkyle.

5. Capteur selon la revendication 2, caractérisé en ce que L_1 , L_2 et L_3 forment ensemble un terpyridine de formule générale (II) suivante :



dans laquelle les radicaux R_1 à R_5 qui peuvent être totalement ou partiellement identiques ou différents les uns des autres représentent l'hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy, un groupe amine
5 primaire, secondaire ou tertiaire ou un groupe pyridine substitué par un groupe hydrogène, un groupe alkyle, un groupe aryle, un groupe hydroxy, un groupe alkoxy, un groupe aryloxy ou un groupe amine primaire, secondaire ou tertiaire.

6. Capteur selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le médiateur est choisi parmi le complexe
10 bis (2,2', 6'2" - terpyridine) de cobalt ou le complexe bis (4' - tolyl - 2,2', 6',2" - terpyridine) de cobalt.

7. Capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que l'enzyme d'oxydo-réduction est choisie parmi les oxydases, les
15 déshydrogénases ou les flavoprotéines.

8. Capteur selon la revendication 7, caractérisé en ce que l'enzyme est la glucose-oxydase et en ce que le capteur permet de mesurer la quantité de glucose présent dans la solution.

9. Capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que
20 l'électrode de référence (22) comprend un collecteur de courant (30) relié électriquement à un contact électrique (26).

10. Capteur selon la revendication 1 ou 9, caractérisé en ce que le collecteur de courant (30, 37) est réalisé sous forme d'une
25 couche d'un matériau choisi parmi l'or, l'argent, le platine, le palladium, le carbone, le graphite ou un oxyde de métal conducteur.

11. Capteur selon la revendication 10, caractérisé en ce que le collecteur de courant (30) de l'électrode de référence (22) est réalisé en argent partiellement chloruré et le collecteur de courant
(37) de l'électrode de mesure (20) est réalisé en platine.

12. Capteur selon la revendication 1, caractérisé en ce que le
30 mélange (38) de l'électrode de mesure (20) comprend en outre une matière conductrice active et en ce que le médiateur transfère les électrons entre l'enzyme et cette matière conductrice active.

13. Capteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que la
35 matière conductrice active est une poudre d'un matériau choisi parmi le carbone, l'or, le platine, le palladium ou un oxyde de métal conducteur.

14. Capteur selon la revendication 12, caractérisé en ce que la matière conductrice active est un film d'un polymère conducteur.

5 15. Capteur selon la revendication 1 ou 12, caractérisé en ce que le mélange (38) de l'électrode de mesure (20) comprend un additif formant un réseau d'immobilisation de l'enzyme du médiateur et/ou de la matière conductrice active sur la surface du collecteur (37) de l'électrode de mesure (20).

10 16. Capteur selon la revendication 15, caractérisé en ce que l'additif est choisi parmi la sérumalbumine bovine, le glutaraldéhyde, le carbodiimide ou des polymères solubles dans l'eau.

17. Capteur selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce qu'il permet de réaliser les mesures de la quantité d'un composant en solution, à un potentiel voisin de 100 mV par rapport à une électrode à Ag/AgCl.

15 18. Ensemble caractérisé en ce qu'il est composé d'un capteur selon l'une quelconque des revendications 1 à 17 et d'un dispositif d'exploitation du signal fourni par ledit capteur, ce dispositif comprenant au moins deux contacts électriques conçus pour être reliés à au moins deux électrodes dudit capteur, un ampèremètre et
20 des moyens d'affichage des résultats.

25

30

35

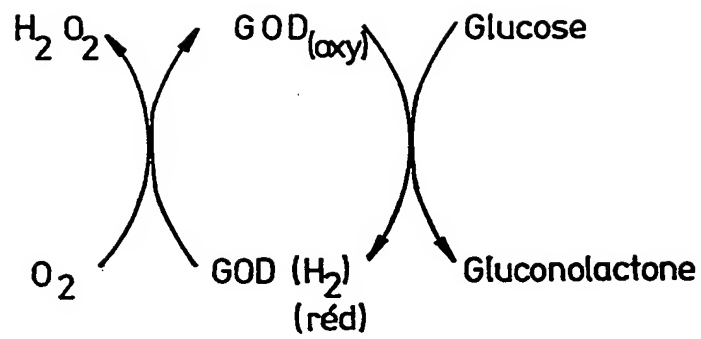


Fig.1

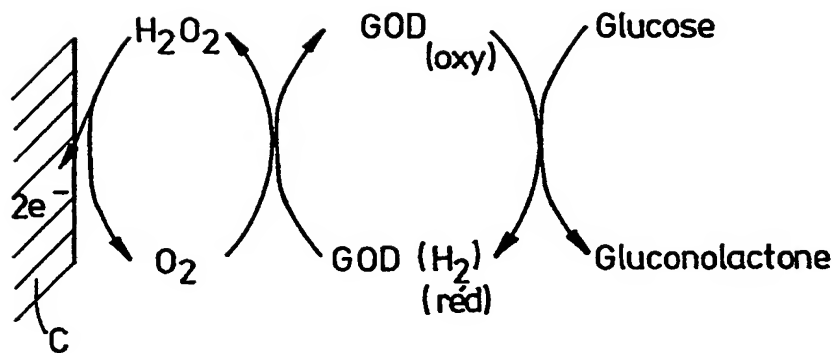
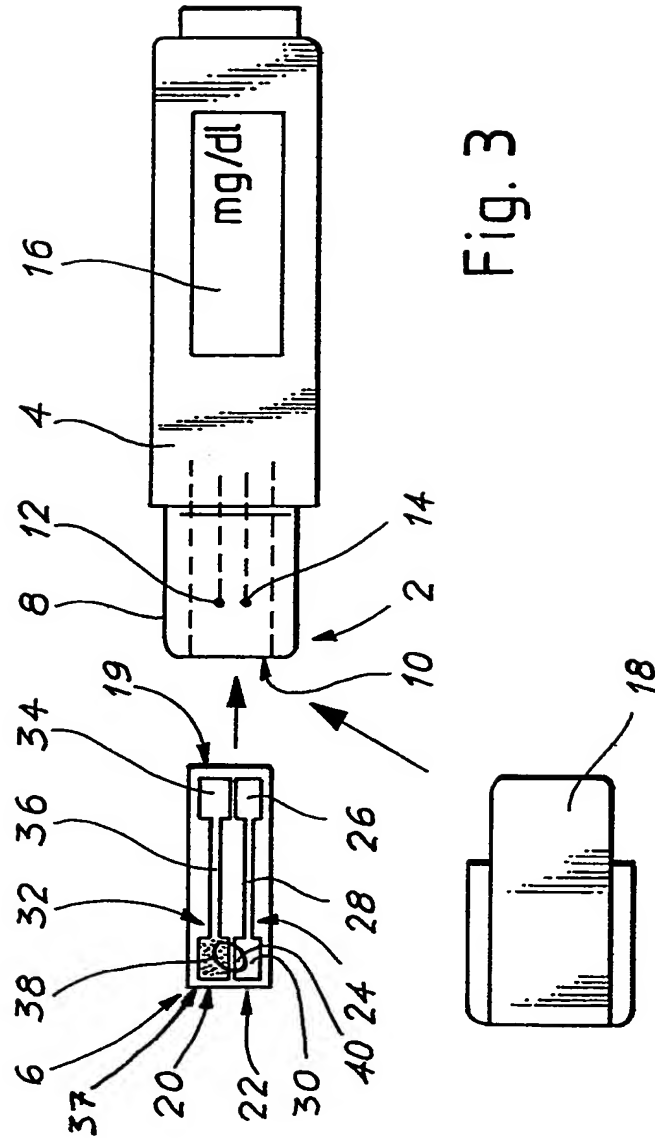


Fig. 2



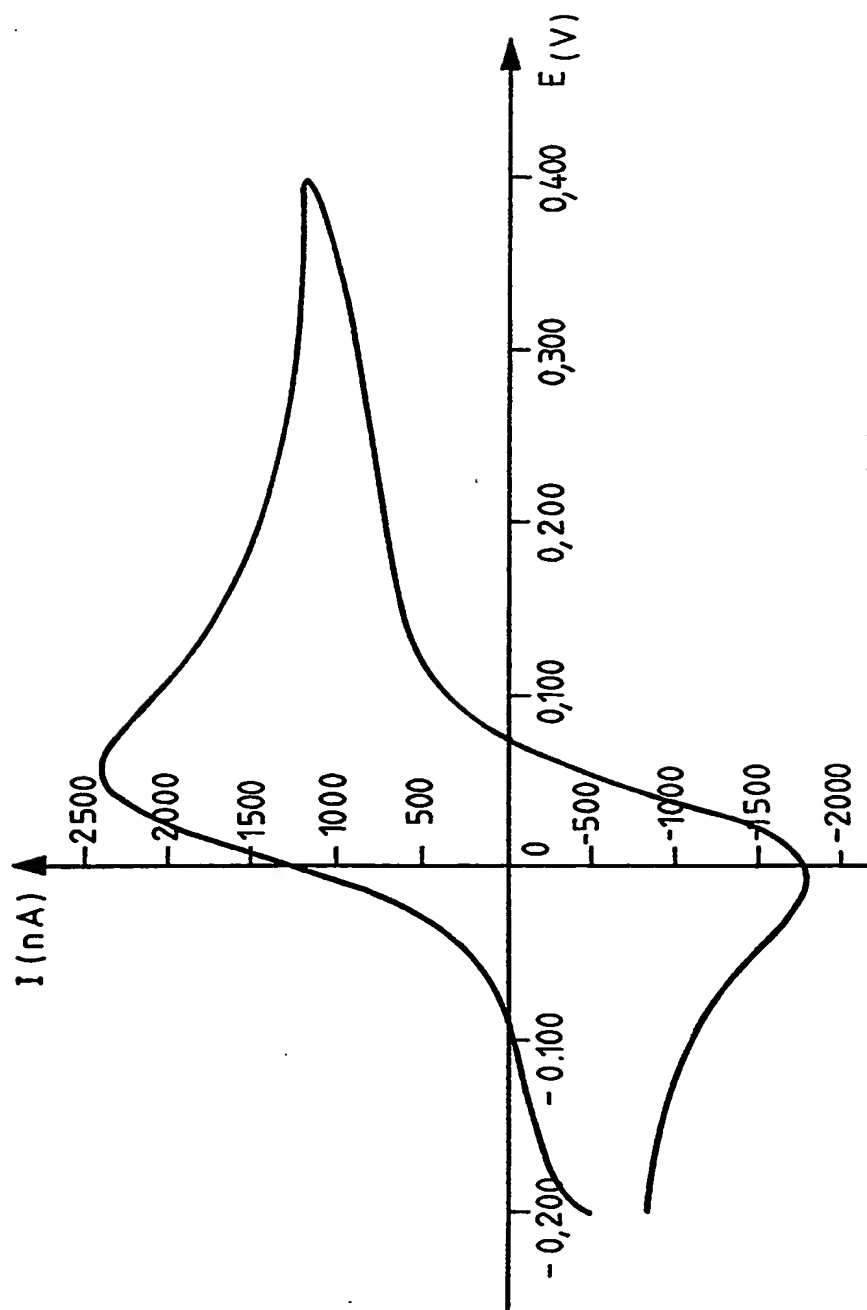


Fig. 4

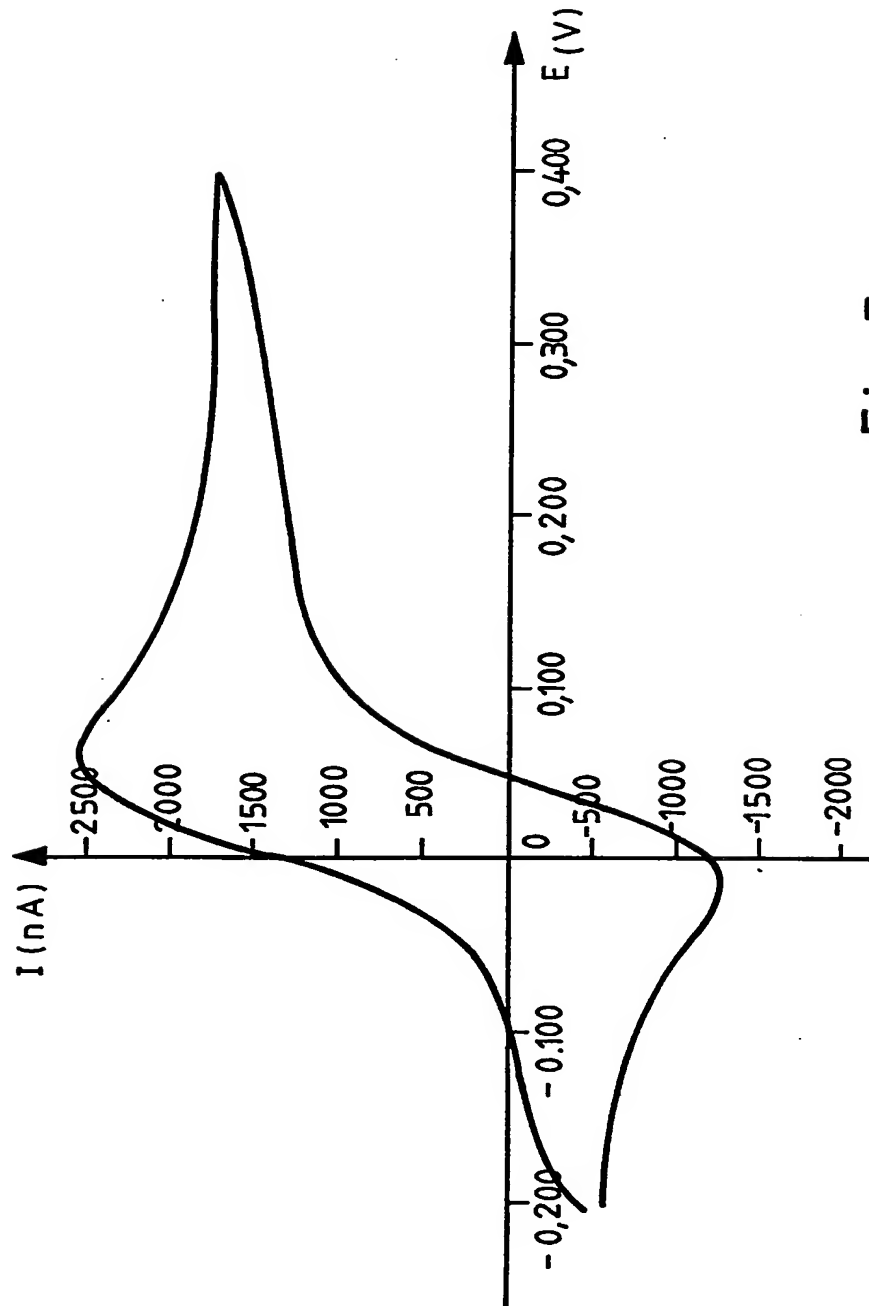


Fig.5

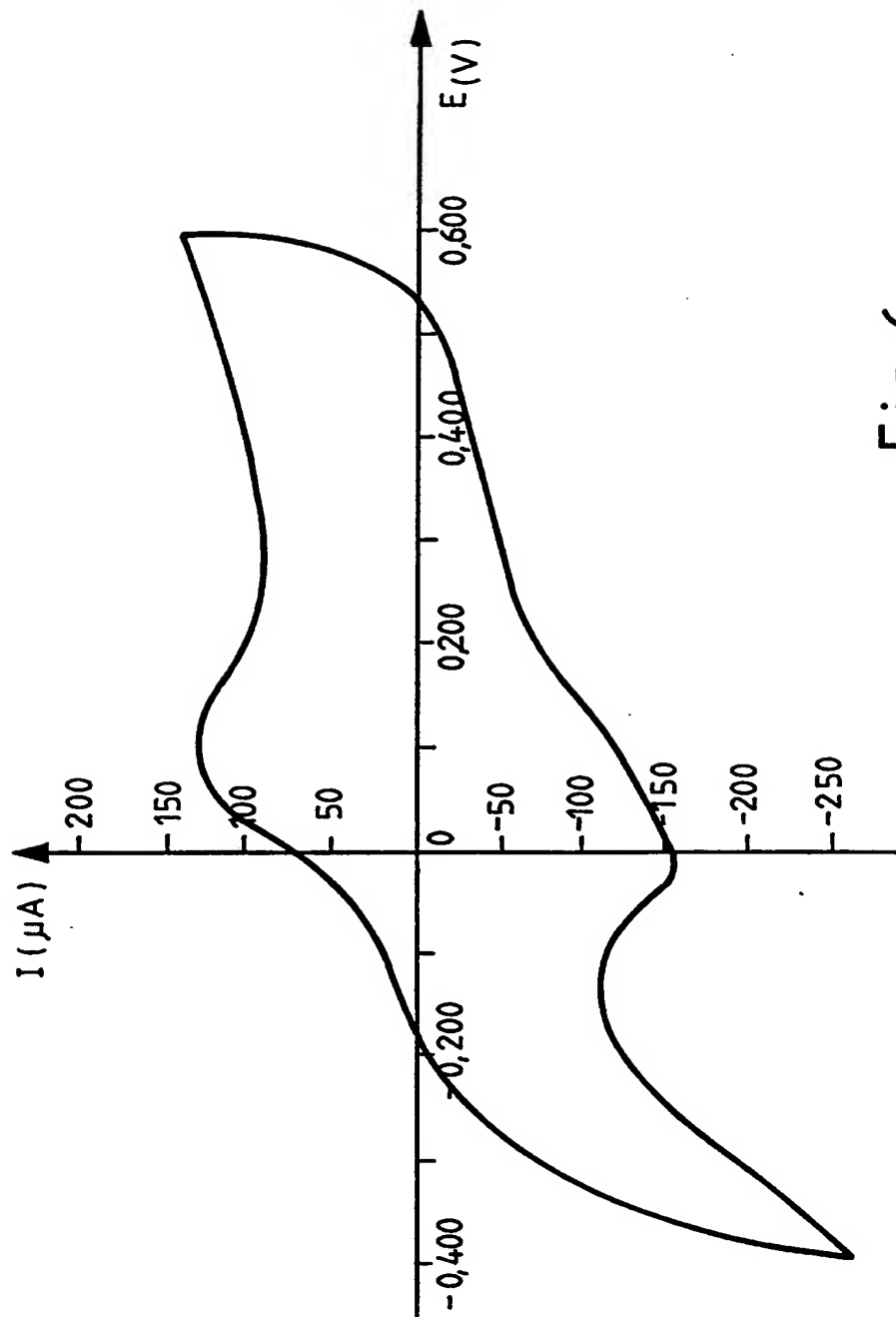


Fig. 6

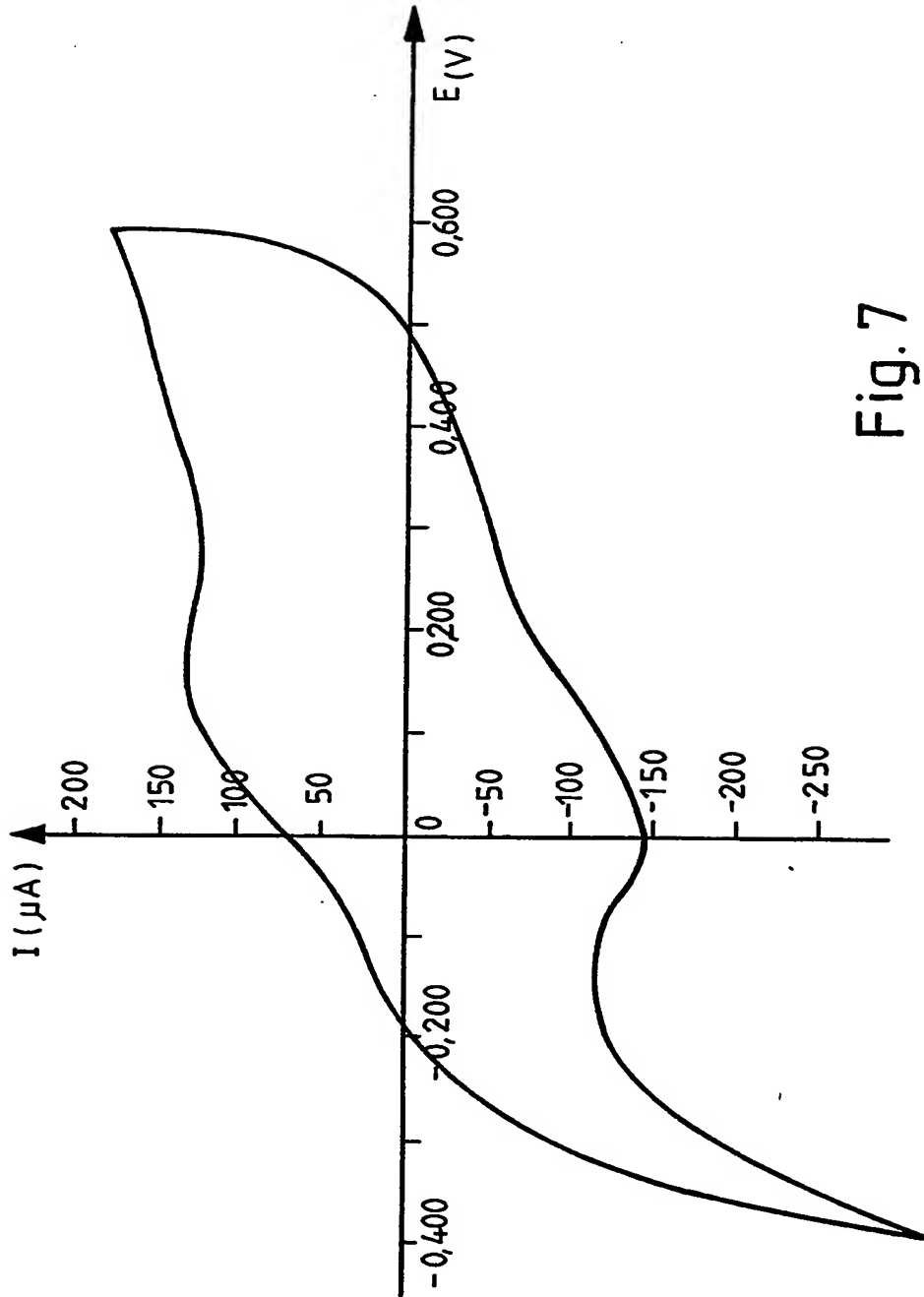


Fig. 7

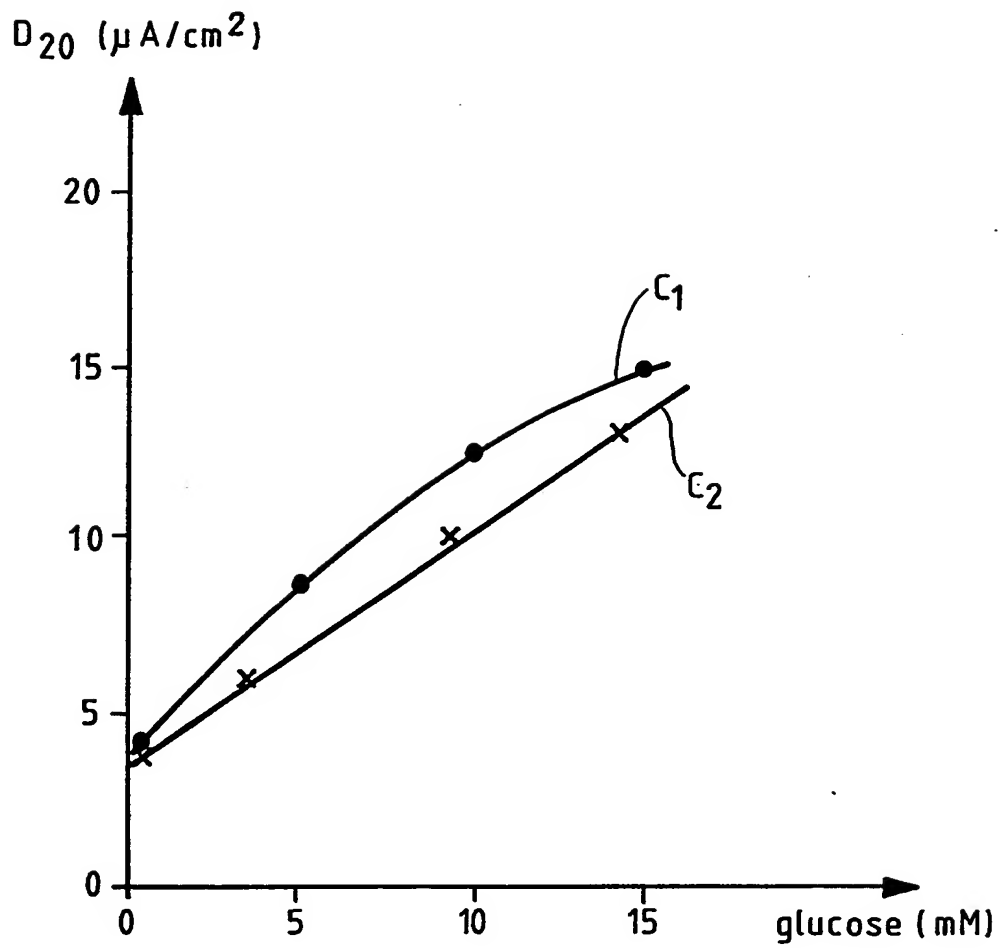


Fig. 8

INSTITUT NATIONAL
de la
PROPRIETE INDUSTRIELLE

RAPPORT DE RECHERCHE
établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FR 9107404
FA 458008
Page 1

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendications concernées de la demande examinée
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes	
X	ANALYTICAL CHEMISTRY vol. 54, 1982, WASHINGTON DC USA pages 1377 - 1383; J.M. JOHNSON ET AL: 'Potential-dependent enzymatic activity in an enzyme thin-layer cell' *en entier*	1-7, 9-15, 17, 18
Y	EP-A-0 096 288 (BASF) 21 Décembre 1983 * page 2, ligne 27 - ligne 36; exemples PAGE, 5 *	1-18
Y	ANGEWENDTE CHEMIE vol. 102, no. 1, 1990, WEINHEIM BRD pages 109 - 111; M.V. PISHKO ET AL: 'Directer Elektronenaustausch Zwischen Graphitelektroden und einem adsorbierten Komplex aus Glucose-Oxidase und einem Os-haltige Redoxpolymer' *en entier*	1-18
A	JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY vol. 286, 1990, LAUSANNE CH pages 75 - 87; J.P. COLLIN ET AL: 'Anodic electropolymerization of films of polypyrrole functionalized with metal terpyridyl redox centers' *en entier*	1-18
A	BIOCHEMISTRY vol. 24, no. 7, 26 Mars 1985, WASHINGTON DC USA pages 1579 - 1585; J.M. JOHNSON: 'redox activation of galactose oxidase: thin layer electrochemical study' *en entier*	1-18
-/-		
Date d'achèvement de la recherche		Examineur
07 JANVIER 1992		Van Bohemen Ch G
<p>CATEGORIE DES DOCUMENTS CITES</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : pertinent à l'encontre d'au moins une revendication ou arrière-plan technologique général O : divulgation non-écrite P : document Intercalaire</p> <p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons</p> <p>& : membre de la même famille, document correspondant</p>		

EPO FORM 1503 01.87 (P0413)